

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-17698

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)1月25日

C 12 P 21/00
 C 07 K 15/04
 C 12 N 15/00
 C 12 P 19/04
 G 01 N 33/569
 33/577
 // A 61 K 39/395
 C 08 B 37/00
 (C 12 P 19/04
 C 12 R 1:91)

6712-4B
 8318-4H
 7115-4B
 Z-8515-4B
 7906-2G
 7906-2G
 7252-4C
 6779-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全16頁)

⑮ 発明の名称 モノクローナル抗体TS-1およびトリフコシル-N-アセチルラ
 クトサミン糖誘導体

⑯ 特 願 昭61-163046

⑰ 出 願 昭61(1986)7月11日

⑱ 発 明 者 足 立 正 一 群馬県高崎市石原町3493番地の9
 ⑱ 発 明 者 海 津 関 男 東京都昭島市緑町5丁目7-25 ミュキハイツ202号
 ⑲ 出 願 人 株式会社 日本抗体研 群馬県高崎市栄町17番5号
 究所
 ⑳ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

シル-N-アセチルラクトサミン糖誘導体。

1. 発明の名称

3. 発明の詳細な説明

モノクローナル抗体TS-1およびトリフコ

〔産業上の利用分野〕

シル-N-アセチルラクトサミン糖誘導体

本発明は、ヒト癌細胞と特異的に反応する

2. 特許請求の範囲

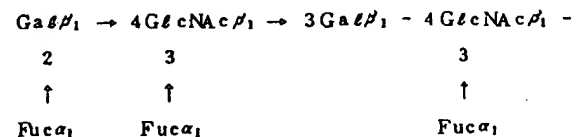
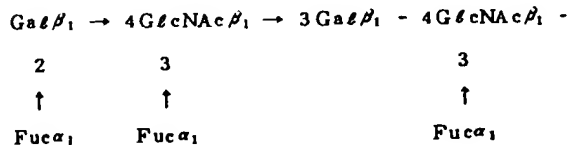
TS-1と命名したモノクローナル抗体、並び

1. ヒト癌細胞と特異的に反応するモノクロー
 ナル抗体TS-1。

にこのモノクローナル抗体と反応する新しい

2. モノクローナル抗体TS-1と特異的に反応
 し、次式

タイプの抗原、すなわちLe^Y構造[Fuca₁→
 2Galβ₁→4(GlcNAc→3)GlcNAc-]とフコシル
 化したタイプ2鎖とからなる次式



(式中、Galはガラクトース、GlcNAcはアセ
 チルグルコサミン、Fucはフコースを示す)

(式中、Galはガラクトース、GlcNAcはアセ
 チルグルコサミン、Fucはフコースを示す)

で表わされる糖の部分構造を有するトリフコ

で表わされる糖の部分構造を有するトリフコ

シル-N-アセチラクトサミン糖誘導体に
関する。

本抗体 TS-1 は上記抗原を有するヒト癌の
診断及び治療に使用でき、また本抗原の構造
は新しいタイプのもので、それ自身能動免疫
の可能な標的として有用であると共に、癌の
診断薬としても有用である。

〔従来の技術〕

モノクローナル抗体作製法は Köhler Milstein
により Biochemical Science に紹介されて以来、
ヒトの癌と特異的に反応するモノクローナル
抗体を選んで、多くの腫瘍関連抗原を規定し
ている。これらの多くは、糖脂質又は糖蛋白
質のいずれかの形として存在する炭水化物抗
原である。このうちの最初の例は、マウスの

S., and Kannagi, R., J. Biol. Chem., 257,
12752-12756, 1982; Pukel et al., J.
Exp. Med., 155, 1133-1147, 1982);
胃腸腫瘍と特異的に反応するモノクローナル
抗体 (N-19-9) は抗原シアリル Le^a ガング
リオシドとして同定された (Kaprowski et al.,
Science, 212, 53-55, 1981; Magnani et
al., J. Biol. Chem., 257, 14365-14369,
1982); 一連のモノ、ジおよびトリフコシ
ルタイプ2鎖 (Gal β ₁→4GlcNAc) 糖脂質マ
ーカーを分離同定した (Hakomori et al., J. Biol.
Chem., 259, 4672-4680, 1984); 特異
的抗体が、異なつた内部構造を有する各々の
タイプの Le^x 抗原に対して作られた (Fukushi
etal., J. Biol. Chem., 259, 4681-4685,

ザルコーマおよびリンフォーマ中のガングリ
オトリオシルセラミドである (Rosenfelder,
G., Young, W.W., Jr., and Hakomori, S.,
Cancer Res., 27, 1333-1339, 1977;
Young, W.W., Jr., and Hakomori, S., Science,
211, 487-489, 1981); Forssman 陰性
個体から誘導された Forssman 抗原 (Hakomori,
S., Wang, S.M., and Young, W.W., Jr., Natl.
Acad. Sci. USA., 74, 3023-3027, 1977);
そして血液型 O 又は B の腫瘍中の A 型様抗原
(Yokota, M., Warner, G., and Hakomori, S.,
Cancer Res., 41, 4185-4190, 1981)。
ヒトのメラノーマに対して作製されたモノク
ローナル抗体の特異的抗原は GD₂ ガングリオ
シドと同定された (Nudelman, E., Hakomori,
1984); そしてこれらの抗原は各種ヒトお
よび動物のカルシノーマから検出された
(Fukushi et al., J. Exp. Med., 159, 506-
520, 1984)。各種のヒト癌細胞のための、
Le^Y 構造に対するモノクローナル抗体を、各
研究室が独立して作製した (Abe et al., J.
Biol. Chem., 258, 11793-11797, 1983;
Brown et al., Bioscience Report, 3, 163-170,
1983; Lloyd et al., Immunogenetics, 17,
337-341, 1983)。

〔発明が解決しようとする問題点〕

上記の抗体は、特別に規定された Le^x およ
び Le^Y に密接に関係しているが、特異性は低
く、Le^Y に対する抗体は正常と癌組織の両方
に反応する。本発明の第1の目的は、Le^Y 構

造、あるいは正常組織とは反応せず、ヒト癌組織と特異的に反応するモノクローナル抗体を開発することである。得られた抗体は腫瘍を検出し、癌診断に有用であり、さらに癌患者を治療するのに有効である。本発明の第2目的は、本モノクローナル抗体と反応する抗原を得ることである。得られた抗原はそれ自身、能動免疫の可能な標的として有用であり、又癌の診断薬、あるいは血中癌抗体を取除く抗体としても有用である。

〔問題点を解決するための手段〕

本願発明者らは、上記各報告に関連して、ヒト癌細胞に対して、より特異性の高いモノクローナル抗体を得るため、鋭意研究を重ねた結果、ヒト癌細胞に極めて特異性の高いモ

い。より具体的には、例えばヒト癌細胞の膜分画物を免疫原として用いる場合は、癌細胞をプロテアーゼ阻害物質等を含む蒸留水中でホモジナイズした後、数回遠心分離を行ない、粗裂膜成分を得る。膜成分懸濁液をPBS等で適当濃度に希釈し、これを動物に2～14日間に毎日～数回投与し、総投与量が蛋白質含量として1～100mg/マウス程度になるようにするのが好ましい。細胞自体を用いる場合は総投与量が $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個/マウス程度となる様にするのが好ましい。免疫細胞としては、最終免疫約3日後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

次いで、かくして得た免疫細胞と骨髓腫細胞を融合する。骨髓腫細胞としては、すでに

ノクローナル抗体を得た。さらに該抗体を用いて、ヒト癌細胞から、当該抗体と特異的に反応する新規な糖鎖構造を有する抗原を分離することに成功した。そして、この糖鎖構造はヒト癌細胞に共通に表現される抗原構造であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明モノクローナル抗体は、ヒトの大腸ガン組織を免疫原として用いて、後述の方法に従って調製出来る。

上記免疫原を免疫する哺乳動物は、例えば、マウス、ラット等が使用される。

免疫は一般的方法によつて行われ、上記の免疫原を生理食塩水、リン酸緩衝食塩水(PBS)等に適当濃度に希釈後、これを動物に静脈内もしくは腹腔内注射等によつて投与すればよ

公知の種々の細胞、例えばマウスにおけるNS-1、P3、P3-U1、X45、SP2、X63、

6.5.3、ラットにおけるY3、Ag1.2.3等が使用される。融合反応は公知の細胞融合方法に準じて行われ、例えば融合促進剤の存在下培地中でインキュベートすることによつて行われる。

融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加することができる。免疫細胞と骨髓腫細胞との使用比は一般の方法と変わりなく、例えば骨髓腫細胞に対し、免疫細胞を約1～

10程度用いればよい。上記融合時の培地と

しては、例えば骨髓腫細胞株の増殖に用いられるようなMEM培地、その他のダルベッコ改質培地、RPMI-1640培地、その他この種の細胞培養に利用される通常の各種培地を利用でき、通常はFCS等の血清を抜いておくのがよい。

融合は、上記免疫細胞と骨髓腫細胞との所定量を上記培地内でよく混ぜ、遠沈後上清を除去し、予め37℃程度に加熱したPEG溶液、例えば平均分子量1000~6000程度のものを通常培地に約30~60W/V%の濃度で加えてまぜあわせることにより行われる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマが形成される。

の検索、及び単一クローン化が行なわれる。該産生株の検索は、例えばELISA法(Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439, 1980)及びプラーク法、スポット法、凝集反応法、RIA法等の一般に抗体の検出に用いられる種々の方法によつて行なわれる〔「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、柳R&Dプランニング発行、昭和57年3月5日〕。より具体的には、所望の癌細胞に選択的に結合し、正常細胞に結合しない抗体産生株を選択する。例えば、癌細胞として肺癌細胞QG-56、QG-90、PC-1、-3、-7、-9、および-10 (Oboshi, S., and Sekiguchi, 蛋白質, 核酸, 酵素, 23, 697-711, 1978); 各種胃癌

所望のハイブリドーマの分離は、上記細胞融合後の細胞を、通常のハイブリドーマ選別用培地で培養することにより行なわれる。前記した骨髓腫細胞株はヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)欠損株であり、したがってHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)中では生育できない。従つてHAT培地中で生育してくる細胞を選択すればよい。該HAT培地での細胞の培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間行えばよい。

かくして得られるハイブリドーマは通常に限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株

(Motoyama, T., Hojo, H., Suzuki, T., and Oboshi, S., Acta Medica Biologica, 27, 49-63, 1979); 表皮腫瘍細胞RT-4、および卵巣アデノカルシノーマSK-OV3 (Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T., J. Natl. Cancer Inst., 59, 221-226, 1977); 単核細胞白血球THP-1 (Tsuchiya, S., et al., Int. J. Cancer, 26, 171-172, 1980); ヒト肺癌細胞LX-1, ヒト乳癌細胞EJ-23等が使用できる。また、正常細胞としては、各種正常絨毛芽細胞、WI-38, L-5、およびCrow-F、および各種ヒトB細胞、Prent-B, Crow-B、およびKasner-B、あるいは外科手術で得られた正常組織片が使用できる。

細胞MKN-1、-2、-28、-45および-74

斯くして得られる本発明のモノクローナル

抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で懸代培養でき、また液体培液中で容易に長時間保存が可能である。本発明者は、このハイブリドーマの代表として、後記実施例によつて得られたものを自ら分離可能な状態に保持している。

上記のようにして得た特定のハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体 TS-1 を得るには、ハイブリドーマを常法に従つて、組織培養をする。すなわち、FCS, ビルビン酸, グルタミンを含有する RPMI-1640 培地で、37℃, CO₂ インキュベーター中で3日以上～7日以内培養して、培養上清から分離する方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物、例えばマウスに投与

入することにより、ラジオイムノアッセイ法 (RIA法) において用いられる標識抗体の製造用原料である標識抗体として利用できる。上記放射性ヨードの導入は、通常のヨード化法、例えばクロラミン T を用いる酸化性的ヨード化法 (W. M. Hunter and F. C. Greenwood, Nature, 194, 495, 1962; Biochem. J., 89, 114, 1963) により標識することができる。

さらに、本発明抗体 TS-1 を蛍光色素で標識することにより、蛍光免疫測定法に利用することができる。その具体例としては、例えばフルオレッゼン・イソチオシアナート (FITC), テトラメチルローダミン・イソチオシアナート (TRITC), 置換ローダミン・イソチオシア

ナート (XRITC), ローダミン B イソチオシア

し増殖させ、その腹水から分離する方法等が採用される。前者の方法は高純度のものを得るのによく、後者の方法は大量生産に優れている。

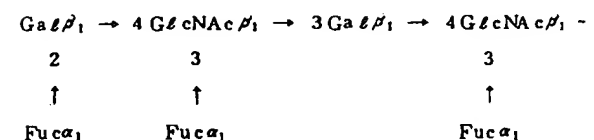
得られたモノクローナル抗体 TS-1 は 2% ホウ酸で沈澱回収し、セファクリル S-300 を用いゲル濾過を行なつた。次いで、クラス・サブクラス特異抗体 (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) を用いて検定し、TS-1 は IgM と同定された。

斯くして得られる抗体 TS-1 は、通常の例えば酵素、蛍光物質又は放射性物質等の標識剤を結合させることによつて、標識抗体 TS-1 を製造することができる。さらに詳しくは、例えばこれに I¹²⁵, I¹³¹ 等の放射性ヨードを添

ナート、ジクロロトリアジンフルオレッゼン (DTAF) 等が挙げられる。蛍光色素の使用量は、特に限定されないが、通常の方法 (特開昭58-35156) に準じて行なわれる。

かくして得られた標識抗体 TS-1 は細胞提示抗原の免疫細胞組織学的検出用として、さらに抗原定量用試薬として利用することができる。

さらに、ヒト癌細胞から、本発明のモノクローナル抗体 TS-1 と特異的に反応する糖の部分構造として式



(式中、Gal はガラクトース、GlcNAc は N

- アセチルグルコサミン、Fuc はフコース、Glc はグルコースを表わす)、を有する糖、または糖脂質などの誘導体を得た。

すなわち、当該糖誘導体は、種々の培養癌細胞、手術組織由来癌細胞等のヒト癌細胞より、常法に従つて、本発明モノクローナル抗体TS-1との反応性を指標として、物理的、化学的、又は生化学的性質を利用する分離手段により分離精製することにより得られる。

例えば、ヒト癌細胞より糖、または糖脂質成分を分離し、これより糖、または糖脂質などの当該性質を利用する化学的、物理的、または生化学的手段、例えばゲル濾過、イオン交換、クロマトフォーカシング、吸着クロマトグラフィー、または高速液体クロマトグラ

フィー、もしくは薄層クロマトグラフィー、等電点電気泳動、または通常の電気泳動法、透析法、抽出法、分配法等を単独、あるいは適宜組合せ、本発明モノクローナル抗体TS-1との反応性を指標として精製分離できる。

[発明の効果]

斯くして得られる本発明モノクローナル抗体はヒト癌細胞と特異的に反応し、特に大腸癌アデノカルシノーマと特異的に反応する。このような癌細胞との反応性を利用し、放射性物質、蛍光物質、または酵素のような標識剤を結合させ、血液学的診断用キットに、あるいは組織学的に免疫細胞組織学的検出法のための試薬として利用できる。さらに当該モノクローナル抗体に制癌剤を結合させ、癌治療に応用することもできる。

さらに、本発明の糖誘導体は、in vitro において酵素的、また化学的合成法によつても製造することができる。

本発明の糖誘導体は、ポリエチレン、ポリスチレン等の合成樹脂、あるいはガラスビーズ等の不溶性担体と共に生理食塩水、緩衝液、あるいは適当な溶媒中で混合させることにより、該糖誘導体と不溶性担体とを物理的に結合させ、不溶性結合体を得ることができる。

得られた不溶性結合体は、体液中に存在す

る自己抗体を除去し、もしくは抗体の単離精製に利用することができる。また、診断用試薬としても使用することができる。

[実施例]

以下、本発明を詳細に説明する為に実施例を挙げるが、本発明はこれ等に限定されるものではない。

実施例

1 - a. ヒトアデノカルシノーマと特異的に反応するモノクローナル抗体の作製

ヒト大腸アデノカルシノーマの膜分画が免

他方、本発明モノクローナル抗体と特異的

疫原として用いられた。腫瘍組織(1.2.~

2.0 ml) は Dounce ホモジナイザー中、プロテアーゼ阻害物質 (10 カリクレイン単位: アプロチニン、シグマ社製) を含む蒸留水 10 ml とホモジナイズした。氷水浴中、50 ストロークでホモジナイズした後、ホモジネートは 2000 rpm で 10 分間遠心分離を行ない、上清を分離した。そして、更に 3500 rpm で 1 時間遠心した。ペレットはアプロチニン含有水 10 ml 中に懸濁した (蛋白質濃度として 2.5 mg/ml)。懸濁液 0.5 ml (蛋白質含量: 1.25 mg) を、4 日間に、4 回静脈内注射した。宿主の脾臓細胞と SP/2 マウスメラノーマとの融合は最終注射後 3 日目に行われた。ハイブリドーマクローンは各種癌細胞と正常細胞とで下記のように選別された。

Crow-B, および Kasner-B は Dr. Cicely Berglund (Pediatric Oncology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle) から供与された。各種の胃腸癌組織、および正常胃腸上皮は外科手術で得られ、凍結切片が作られた。ハイブリドーマの上清は大腸癌組織、および胃癌細胞に陽性反応を示したが、正常組織と細胞には陰性を示した。25 クローンのうち、1 つのクローンが IgM 抗体を分泌し、大腸癌組織と強い反応性を示したが、胃癌組織と細胞では反応は弱かった。このハイブリドーマを再クローンし、TS-1 と名命した。ハイブリドーマ作製法は Köhler-Milstein (Nature, 256, 495-497, 1975), およびその変

法 (J. Exp. Med., 150, 1008-1019,

肺癌細胞 QG-56, QG-90, PC-1, -3, -7, -9, および -10 (Oboshi, S. and Sekiguchi, M., 蛋白質・核酸・酵素, 23, 697-711, 1978); 各種胃癌細胞 MKN-1, -2, -28, -45, および -74 (Motoyama, T., Hojo, H., Suzuki, T., and Oboshi, S., Acta Medica Biologica, 27, 49-63, 1979); 表皮腫瘍細胞 RT-4, および卵巣アデノカルシノーマ SK-OV3 (Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T., J. Natl. Cancer Inst., 59, 221-226, 1977); 単核細胞白血球 THP-1 (Tsuchiya, S. et al., Int. J. Cancer, 26, 171-172, 1980); ヒト肺癌細胞 LX-1, ヒト乳癌細胞 EJ-23, 各種正常繊維芽細胞, WI-38, L-5, および Crow-F, および各種ヒト B 細胞, Prent-B,

1979) に記載され、一般に知られ、そして十分に確立された方法である。

ハイブリドーマは、上清中に存在する抗体の反応性、すなわち抗体結合アッセイで測定して選別した。このアッセイ法は、細胞あるいは組織を抗体とインキュベートし、次いで第 2 抗体と I^{125} protein A とインキュベートする方法で、多くの研究者により良く用いられている (Young, W. W., MacDonald, E. M. S., Nowinsky, R. C., and Hakomori, S., J. Exp. Med., 150, 1008-1019, 1979; Fukushi, Y., Hakomori, S., Nudelman, E., and Cochran, N., J. Biol. Chem., 259, 4681-4685, 1984)。ハイブリドーマは FCS、ビルビン酸とグルタ

ミンの含有する RPMI-1640 培地中培養し、

限外希釈法で繰返しクローンした。そして最後に、クローンはプリステンで前処理した Balb/c マウスの腹腔中に入れ、産生された抗体を腹水液として採取した (Young, W. W., MacDonald, E. M. S., Nowinsky, R. C., and Hakomori, S., J. Exp. Med., 150, 1008-1019, 1979)。

抗体はセフアクリル S-300 によるゲル透過により精製した後、サブ・クラス特異抗体 (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) を用い調べ、抗体 TS-1 は IgM として同定した。

以下余白

性染色の強度が AH-6 より低い。

表 1 正常大腸粘膜と大腸癌粘膜中の L_o^Y 抗原、及び TS-1 提示抗原の反応性の比較

		AH-6 抗体 との反応性	TS-1 抗体 との反応性
正常大腸粘膜	近位部	[*] 18/20	1/20
	遠位部	15/20	0/20
大腸癌	近位部	^{**} 28/30	24/30
	遠位部	^{**} 30/30	19/30

* : 分子の反応陽性率の数 (細胞の 50% 以上が陽性である数)、分母は試験数を示す。

** : 陽性染色の強度は正常粘膜より、大腸癌粘膜の方がはるかに強く示した。

1-b 抗体 TS-1 による大腸癌患者の癌細胞の検出。

正常大腸粘膜と大腸癌粘膜中の L_o^Y 抗原と本発明モノクローナル抗体 TS-1 によつて規定される抗原の反応性について比較した。この結果、表 1 に示すように、TS-1 と反応する抗原が大腸癌において特異的に出現することが判る。この結果は、大腸癌を検出するための抗体 TS-1 の特異性は AH-6 のような単純な L_o^Y を検出する抗体よりもはるかに高いことを示している。腫瘍に隣接した粘膜表皮、および他の粘膜表皮の正常部位は抗体 TS-1 に対して陰性を示す。抗体 AH-6 はこの部位も陽性反応を示す点で、対照的である。しかも十分に分化した大腸癌では抗体 TS-1 の陽

本発明抗原は十分に、または中程度に分化した腫瘍によく検出される。この傾向は AH-6 により規定された L_o^Y に対しても見られる。癌と隣接した正常粘膜間での陽性、および陰性染色差を比較したとき、TS-1 抗体は癌に対しては非常に高い陽性率を示し、隣接正常粘膜に対しては陰性を示す。抗体 AH-6 は腫瘍関連 L_o^Y 抗原を検出すると考えられて来たが (Abe, K., Melibbin, J. M., and Hakomori, S., J. Biol. Chem., 258, 11793-11797, 1983; Abe, K., Hakomori, S., and Ohehisa, S., Cancer Res., 46, 2639-2644, 1986)、正常組織と反応陽性率が比較的に高い。これに対して、本発明抗体 TS-1 は癌組織を検出するのに AH-6 よりはるかに特異

性が高い。

1 - c ヒト癌組織、および細胞から糖脂導体の検出。

ヒト癌細胞又は組織をイソプロパノール／ヘキサン／水 (55 : 25 : 20, v/v/v) でホモジナイズし、その抽出物をクロロホルム／メタノール／水中 Folch の分画に分ける。その上層糖脂質分画を上記の方法で処理する (Kannagi, R., Nudolman, E., Lovary, S. B., and Hakomori, S., J. Biol. Chem., 257, 14865-14874, 1982)。HPLC で分離された糖脂質パターンを上記の免疫染色法で検出した (Magnani, J. L., Smith, D. F., and Ginsborg, V., Anal. Biochem., 109, 399-402, 1980)。典型的なパターンを第1図

に示す。すなわち、HPTLC で糖脂質抗原を分離した後、抗 Le^Y 抗体 AH-6 と TS-1 により免疫染色した。

A : オルシノール染色 ; B : 抗体 AH-6 で免疫染色 ; C : 抗体 TS-1 で免疫染色。糖脂質試料は同量の組織 (蛋白質に基づいて) から抽出した。大腸腺ノカルシノーマからの糖脂質の収率は約 200 ~ 350 μg / 100 μg 蛋白質、正常細胞を組織からは約 100 ~ 200 μg / 100 μg 蛋白質。各 HPTLC プレートにのせた試料の量は組織蛋白質の 1.0 μg に相当する。図中 A、B および C の 1-9 は共通した試料である。

1 : A 型赤血球膜 ; 2 : B 型赤血球膜 ; 3 : B 型赤血球膜 ; 4 : 正常肝 ; 5 : 正常大腸

粘膜 ; 6 : 大腸癌組織、症例 20 ; 7 : 肝癌 (肝の腺ノカルシノーマ)、症例 G-06 ; 8 : 3 つの Le^Y 糖脂質標準物質。 $\text{H}^3\text{FucN}^2\text{FucnLe}_6$ (上のバンド)、 $\text{V}^3\text{FucN}^2\text{FucnLe}_6$ (中間のバンド)、 $\text{H}^3\text{FucV}^3\text{FucN}^2\text{FucnLe}_6$ (下のバンド) ; 9 : 大腸癌、症例 45。

1 - d 抗体の特異性

抗体 TS-1 は、第2図に示すように、抗原トリフコシル Le^Y と反応したが、セラミドヘキササツカライドと反応せず、又 Le^X 構造をもつた各種の糖脂質とも反応しない。すなわち、第2図はモノクローナル抗体 TS-1 と各種のフコシル Type 2 鎖抗原との反応性を示す。反応性は各種濃度の糖脂質 (横座標に示した) にたいして5倍量のレシチンと3倍量

のコレステロールの混合比で固着ラジオイムノアッセイにより測定した。これらの脂肪混合物はビニールストリップアウエル上でカウントした。抗体-抗原結合アッセイは上記の方法により 1 : 10000 に希釈した TS-1 抗体で行われた (Kannagi, R., Stroup, R., Cohran, N. A., and Hakomori, S., Cancer Res., 43, 4997-5005, 1983)。A : Le^X ヘパタサツカライド ($\text{V}^3\text{FucnLe}_6$, O 型赤血球から) ; B : 大腸癌組織から単離した A と同じ抗原 ; C : Extended Le^Y ($\text{H}^3\text{FucV}^3\text{FucnLe}_6$, 大腸癌から) ; D : ジメリック Le^X ($\text{H}^3\text{FucV}^3\text{FucnLe}_6$, 上のバンド) ; E : 移動度の遅い同じ抗原 ; F と G : トリフコシル Le^Y 構造をもつた移動度の遅い抗原の二つの

バンド; H: 精製した Extended L_{α}^Y 抗原
($H^2FucV^2FucL_{\alpha}$)。

2-a 抗原 TS-1 により規定される抗原構造の特異性

抗体 TS-1 の抗原は、腫瘍細胞又は組織が Folch - Pi らの方法 (J. Biol. Chem., 226, 497-509, 1957) により、クロロホルム/メタノール (2:1) で抽出され、そして Svennerholm の変法 (Acta Chem. Scand., 17, 239-250, 1963) により、クロロホルム/メタノール/0.1% NaCl (1:10:10) で繰返し分配抽出した場合に、その大部分が中性脂質分画中に検出された。上層は DEAE-セフアデックス (Yu, P. K., and Ledeen, K. W., J. Lipid Res., 13, 680-686,

トロピーズ 6 R-8010 (Iatron Chemical Co. 製) を充填したカラム (1×50 cm) を用いた HPLC により各種の脂質に分ける。溶出プログラムはカラムにかけた試料の量により異なる。一つの典型的な条件は以下のようである。カラムはイソプロピルアルコール/ヘキサン/水、50:40:5 から 55:25:20 (v/v/v) の溶媒勾配で、15分間溶出が行なわれる。そして更に50分間、同溶媒で溶出される。1.0 ml/分の流速になるように圧を調整する。各試験管あたり 2.0 ml の分画でフラクションコレクターにて分取する。各分画より 5 μ l を HPTLC (Merk Dramatadl 社製) にのせ、ク

1972) により分離すると、活性が中性脂質分画にある。すぐれた方法として、組織や細胞をイソプロパノール/ヘキサン/水 (55:20:25) で抽出する方法がある (Kannagi, R., Nudelman, E., Lavery, S. B., and Hakomori, S., J. Biochem., 257, 14865-14874, 1982)。この方法では、抗原が完全に抽出できる抽出物は DEAE-セフアデックスで中性脂質とシアリルガングリオンドに分離される。さらに、抗原を渡辺と荒尾 (J. Lipid Res., 22, 1020-1024, 1981) として神奈木ら (J. Biol. Chem., 257, 14865-14874, 1981) による、既に記載された方法によりイソプロパノール/ヘキサン/水で平衡化した極性シリカゲル、イア

10...v/v/v) で展開分離する。そして HPTLC プレートは Magnami, Smith と Ginsburg (Anal. Biochem., 109, 399-402, 1980) により TS-1 抗体で免疫染色した。また、HPLC からの各分画は HPTLC で分析し、さらに抗体 SSEA-1, FH-4, および AH-6 によつて分析された。本抗原は分画、H (チューブ No 80~89) に溶出された。他の分画は強い反応性を示さなかつた。これは、AH-6 抗体により規定された L_{α}^Y 抗原と著しい対照をなし、そしてもつと大きなスポットを示した。分画は H は、さらにイアトロピーズ 6 RS-8010 カラム (1×30 cm) による HPLC で繰返し、イソプロパノール/ヘキサ

クロホルム/メタノール/水 (50:40:50) の勾配法で60分間溶出した。流速は

0.5 ml/分であつた。活性成分は溶出され、TS-1 抗体で免疫染色し、確認された。そしてさらに、調整用 HPTLC により精製された。この時、螢光指示薬としてアリムリン (Aldrich Chemical Co. 製) を噴霧して UV ライトにて検出した (Skipski, V. P., *Methods Enzymol.*, 35, 396-425, 1975)。

HPTLC で分離した糖脂質分画はプレートからかき取り、インプロパノール/ヘキサン/水 (55:20:25, v/v/v) で超音波をかけながら10分間抽出、ついで遠心分離を行なつた。このようにして精製した抗原は炭水化物残基に関しては均一である。抗原成分の構造は以下のようにして同定された。

i 抗原は AH-6 抗体と強く反応することか

and Hakomori, S., *J. Biol. Chem.*, 259, 8444-8451, 1984) により決定した。

iv 2つのフコシル残基は Le^Y 決定基の末端 Gal とその次の GlcNAc についている。さらに別の Fuc は Le^Y に結合しているタイプ2鎖の GlcNAc

$$\left(\text{Le}^Y \rightarrow 3 \text{Gal}\beta_1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc} \begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ \text{Fuc}\alpha_1 \end{array} \right)$$

に結合して存在している。本抗原は *Charonia lampas* α -fucosidase で処理すると、その分解物は Dimeric Le^X、 $\text{H}^2\text{FucV}^3\text{FucnLe6}$ に一致し、特異抗体 FH-4 と反応した (Fukushi, Y., Hakomori, S., Nudelman, E., and Cochran, N., *J. Biol. Chem.*, 259, 4681-4685, 1984)。

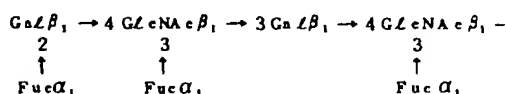
以上の結果より、本発明モノクローナル抗

ら、Le^Y 決定基を有する。Le^Y に対する AH-6 抗体の反応性は、既に十分同定されている (Abo, K., Mekibbin, J. M., and Hakomori, S., *J. Biol. Chem.*, 258, 11793-11797, 1983)。

ii ガスクロマトグラフィーのデータに基づき、セラミドあたり3ヶ以上の Fuc、3ヶ以上の Gal、2ヶの GlcNAc、および1ヶの Glc 残基からなる。

iii 糖の結合部位と構造はメチル化分析 (Hakomori, S., *J. Biochem. (Tokyo)*, 55, 205-208, 1964; Björndal, H., Lindberg, B., and Svensson, S., *Carbohydr. Res.*, 5, 433-440, 1967), および化学イオン化マスペクトルの改良法 (Kannagi, R., Lavery, S. B.,

体 TS-1 と特異的に反応する抗原は、糖の部分構造として、次の式を有する



トリフコシル-N-アセチルラクトサミン糖誘導体である。

2-b 高分解能¹H-NMRによる抗原構造の解析。

上記精製手段により精製した当該糖誘導体を高分解能¹H-NMR(500MHz)にて解析を行なつた。当該精製糖誘導体100~200 μ gを2% D₂Oと1% TMS(テトラメチルシラン)を含有するDMSO(ジメチルスルホオキサイド)に溶解し、¹H-NMRに付与し、

328°Kにて行なつた。

その結果を表 2 - a、2 - b 及び表 3 に示

す。表中 A : Fuc1 \rightarrow 2; B : Gal β ₁; C : Fuc1

\rightarrow 3; D : 4GlcNAc β ₁; E : 3Gul β ₁; F : Fuc1

\rightarrow 3; G : 4GlcNAc β ₁; H : 3Glc β ₁; I :

1 ceramido を示す。

また、表中数字は各プロトンの ppm を、()

内の数字はカップリング定数を示し、単位は

Hzである。

以下余白

表 2 - a

A	B	C	D	E
4.229 (J:7.3)	4.229 (J:7.3)		4.687 (J:7.9)	
	4.295 (J:7.3)	4.876 (J:4.3)	4.748 (J:7.9)	
4.973 (J:4.3)	4.604 (J:6.7)	4.875 (J:7.3)	4.712 (J:7.9)	
	4.228 (J:7.3)		4.682 (J:8.9)	4.280 (J:7.9)
	4.291 (J:7.3)	4.876 (J:4.3)	4.744 (J:7.9)	4.286 (J:7.3)
	4.300 (J:7.3)	4.878 (J:3.7)	4.754 (J:7.9)	4.345 (J:6.7)
4.973 (J:3.7)	4.401 (J:7.3)	4.876 (J:4.3)	4.714 (J:7.3)	4.285 (J:7.3)
4.973 (J:3.7)	4.407 (J:6.7)	4.876 (J:4.3)	4.728 (J:7.3)	4.343 (J:6.7)

表 2 - b

F	G	H	I
		4.276 (J:7.3)	4.173 (J:7.9)
		4.289 (J:7.3)	4.206 (J:7.9)
		4.276 (J:7.3)	4.223 (J:7.9)
	4.682 (J:8.5)	4.280 (J:7.9)	4.172 (J:7.9)
	4.681 (J:8.5)	4.273 (J:7.3)	4.172 (J:7.9)
	4.741 (J:7.9)	4.276 (J:7.3)	4.207 (J:7.9)
4.878 (J:3.7)	4.684 (J:7.9)	4.276 (J:7.3)	4.172 (J:7.9)
4.876 (J:4.3)	4.743 (J:7.9)	4.279 (J:7.9)	4.172 (J:7.9)

表 3 は同一条件で解析した各フコースの H-5 と H-6 の結果である。表中 A は Fuc α_1 → 2、C は Fuc α_1 → 3、F は Fuc α_1 → 3 をそれぞれ示し、数字は各プロトンの ppm を表す。

表 3

A		C		F	
H-5	H-6	H-5	H-6	H-5	H-6
		4.590	1.020	—	—
4.027	1.103	4.644	1.060	—	—
		4.589	1.020	—	—
		4.604	1.020	4.592	1.015
4.027	1.103	4.640	1.072	—	—
4.025	1.101	4.653	1.072	4.586	1.014

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は HPTLC で分離した鎖抗原を抗 L \cdot Y 抗体 AH-6 と本発明抗体 TS-1 により免疫染色した結果を示す。第 2 図はモノクローナル抗体 TS-1 と各種のフコシルタイプ 2 鎖抗原との反応性を示す。

以 上

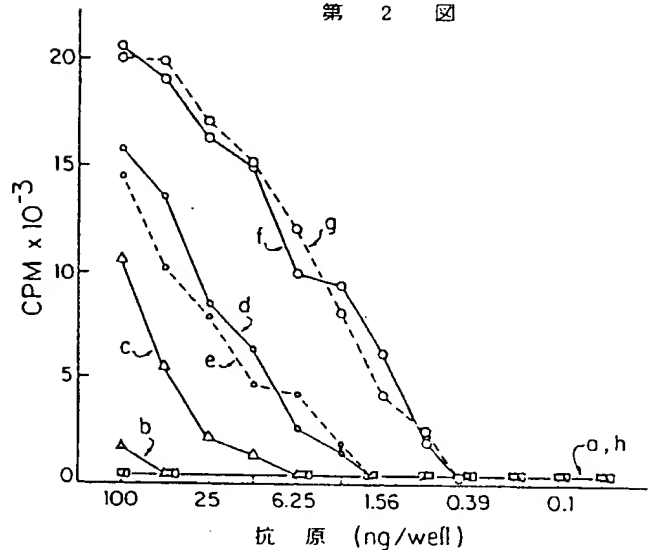
出 願 人 株式会社 日本抗体研究所

代 理 人 弁理士 有 賀 三 幸

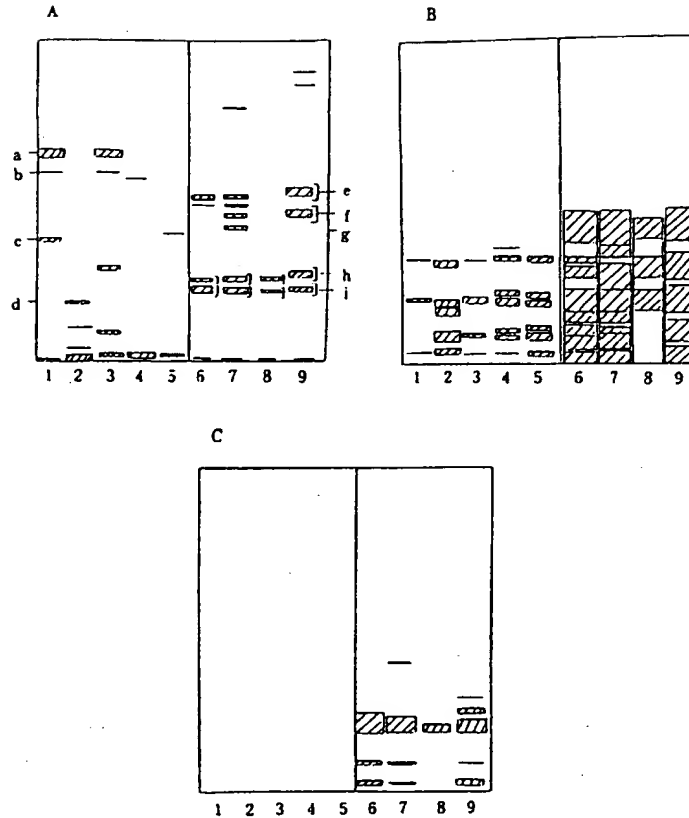
弁理士 高 野 登志雄

弁理士 小 野 信 夫

第 2 図



第 1 図



手続補正書(自発)

昭和62年6月23日

特許庁長官 小川 邦 夫 殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第 163046 号

2. 発明の名称

モノクローナル抗体TS-1およびトリフコシル-
N-アセチルラクトサミン糖鎖抗体

3. 補正をする者

事件との関係 出願人
名 称 株式会社 日本抗体研究所

4. 代理人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)
共同ビル 電話(669)09040
氏 名 (6870) 弁理士 有 賀 三 幸
住 所 同 上
氏 名 (7756) 弁理士 高 野 登 志 郎
住 所 同 上
氏 名 (8632) 弁理士 小 野 信 夫

5. 補正命令の日付

日 発

6. 補正の対象

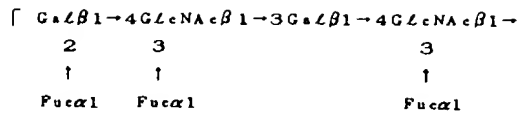
明細書の「特許請求の範囲」および「発明
の詳細な説明」の図

7. 補正の内容

(1) 明細書の「特許請求の範囲」を別紙の如く
訂正する。

(2) 明細書中、第2頁、第7~8行

「 $[Fuc\alpha_1 \rightarrow 2Gal\beta_1 \rightarrow 4(Fuc\alpha_1 \rightarrow 3)GlcNAc-]$ 」と
あるを、「 $[Fuc\alpha_1 \rightarrow 2Gal\beta_1 \rightarrow 4(Fuc\alpha_1 \rightarrow 3)GlcNAc-]$ 」
と訂正する。(3) 同第2頁、第10~13行、同第18頁、
第12~15行および同第42頁第3~6行
の式を次式の通り訂正する。



(4) 同第3頁、第9行

「作製法は」とあるを「作製法が」と訂正する。

(5) 同第3頁、第12～13行

「選んで、……多くは、」とあるを
「選ぶことにより、多くの腫瘍関連抗原が明らかにされた。これらの抗原の多くは、」と訂正する。

(6) 同第4頁、第13行

「ヒトのメラノーマに対して作製された」とあるを
「近年、ヒトのメラノーマに対する」と訂正

する。

(7) 同第5頁、第12～13行

「特異的抗体が、」とあるを削除する。

(8) 同第5頁、第14行

「対して作られた」とあるを
「対する特異抗体が作られた」と訂正する。

(9) 同第6頁、第4～6行

「各種の……作製した」とあるを
「それぞれ独立の研究室は、各種のヒト癌細胞、すなわち Lo^Y 構造決定基に対するモノクローナル抗体を作製した」と訂正する。

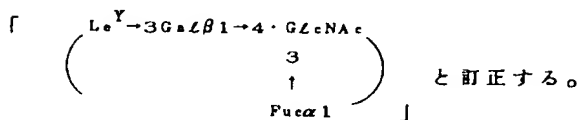
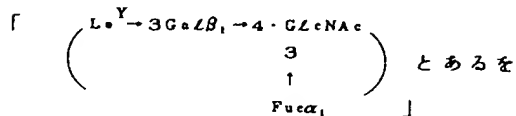
04 同第16頁、第5行

「TS-1は」とある次に、「50%硫酸沈殿物の透析分画を」を挿入する。

05 同第19頁、第10行および第11行

「または」とあるを削除する。

02 同第41頁、第6行



03 同第41頁、下から第6行

「 $\text{D}^3\text{FucV}^3\text{FucnLe}_6$ 」とあるを
「 $\text{D}^3\text{FucV}^3\text{FucnLe}_3$ 」と訂正する。

04 同第43頁、第1～2行

「表3に示す。」とあるを
「表3にグルシルH-1ケミカルシフトとして示す。」と訂正する。

05 同第43頁、第2～4行

「B: $\text{Ga}\beta 1$; C: $\text{Fuc}1 \rightarrow 3$; D: $4\text{GLeNAc}\beta 1$; E: $3\text{Ga}\beta 1$; F: $\text{Fuc}1 \rightarrow 3$; G: $4\text{GLeNAc}\beta 1$; H: $3\text{GLe}\beta 1$; I:」とあるを

「B: $\text{Ga}\beta 1$; C: $\text{Fuc}1 \rightarrow 3$; D: $4\text{GLeNAc}\beta 1$; E: $3\text{Ga}\beta 1$; F: $\text{Fuc}1 \rightarrow 3$; G: $4\text{GLeNAc}\beta 1$; H: $3\text{GLe}\beta 1$; I:」と訂正する。

06 同第46頁、第2～3行

「H-5とH-6の結果である。表中Aは $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2$ 、Cは $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3$ 、Fは $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3$ 」とあるを

「H-5とH-6ケミカルシフトの結果である。表中Aは $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2$ 、Cは $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3$ 、Fは $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3$ 」と訂正する。

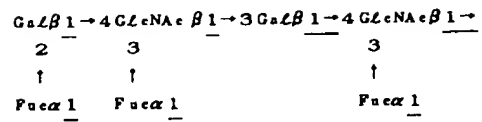
特許請求の範囲

1. ヒト癌細胞と特異的に反応するモノクロー

ナル抗体 TS-1。

2. モノクローナル抗体 TS-1 と特異的に反応

し、次式



(式中、GaL はガラクトース、GLcNAc はアセ

チルグルコサミン、Fuc はフコースを示す)

で表わされる糖の部分構造を有するトリフコ

シル-N-アセチラクトサミン糖鎖導体。